

NACHWEIS BICARBONATBINDENDER PROTEINFRAKTIONEN
IM SCHALENDRÜSENSEKRET DER LEGEHENNE

von

Jan Hendrik Brand

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für
Tierzucht und Tierernährung

der

Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Kurt Bronsch

Nachweis bicarbonatbindender Proteinfractionen
im Schalendrüsensekret der Legehennen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jan Hendrik Brand

Tierarzt
aus Berlin

Berlin 1972

Journal-Nr. 773

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinär-
medizin der Freien Universität Berlin

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. K. Lörcher
Korreferent: Prof. Dr. K. Bronsch

Tag der Promotion: 14.2.1972



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATUR	2
A. Kurzer Überblick über Bau und Funktion des Legeapparates beim Huhn sowie über die Bestandteile des Eiklars und die Bildung der Eischale	2
B. Das Schalendrüsensekret	10
E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n	
III. ARBEITSPLAN	16
IV. MATERIAL UND METHODIK	18
A. Versuchstiere	18
B. Entnahme von Schalendrüsensekret	19
C. Zur quantitativen Proteinbestimmung	21
D. Untersuchungen über die Eigenschaften der Proteinfractionen im Schalen- drüsensekret	21
E. Ermittlung der Einlagerung von ^{14}C in die Eischale nach Infusion von protein- gebundenem und freiem ^{14}C -Bicarbonat in die Schalendrüse	30
V. ERGEBNISSE	33
A. Der Gesamtproteingehalt im Schalen- drüsensekret	33
B. Die Differenzierung und Identifizierung der Proteine	33
C. Das Bindevermögen der Schalendrüsensekret- proteine für ^{59}Fe und $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$	37
D. Die Bindung von ^{14}C -Bicarbonat an Con- albumin und Transferrin	42
E. Der ^{14}C -Einbau in den mineralischen Teil der Eischale nach Infusion von proteingebundenem und freiem ^{14}C -Bi- carbonat in die Schalendrüse von Legehennen	44

VI. DISKUSSION	47
A. Zum Gesamtproteingehalt des Schalendrüsensekrets	47
B. Zur Herkunft der Proteine im Schalendrüsensekret	48
C. Zur Fähigkeit des Conalbumins, Bicarbonat bei der Eischalenbildung zu transportieren	50
VII. ZUSAMMENFASSUNG	53
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	55

I. EINLEITUNG

Zahlreiche, mit der Entstehung von Vogeleischalen zusammenhängende Fragen sind noch nicht geklärt. So fehlen z. B. genaue Kenntnisse über das Sekret der Schalendrüse, durch welches dem bereits mit Eihäuten versehenen Ei die zur Schalenbildung erforderlichen Baustoffe zugeführt werden.

Dieses Sekret ist bisher nur hinsichtlich seiner anorganischen Bestandteile untersucht worden; Angaben über dessen organische Inhaltsstoffe beschränken sich auf den Gehalt an Eiweiß, welches mit Eiklar identisch sein soll.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Proteingehalt des Schalendrüsensekrets von Legehennen in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Schalendrüse zu bestimmen, die einzelnen Proteine elektrophoretisch zu trennen und mit den Eiweißfraktionen des Eiklars zu vergleichen. Weiterhin soll unter Verwendung von radioaktiv markierten Indikatoren geklärt werden, ob das Schalendrüsensekret ein Bicarbonat bindendes Protein enthält - und falls ja, ob im mineralischen Teil der Eischale Radiokohlenstoff nachzuweisen ist, wenn während der Eischalenmineralisierung proteingebundenes ^{14}C -Bicarbonat direkt in die Schalendrüse infundiert wird.

II. LITERATUR

Über die im Schalendrüsensekret der Legehenne enthaltene Eiweißmenge liegen in der Literatur nur wenige Angaben vor. Während hinsichtlich Herkunft und Funktion dieser Eiweiße lediglich Hypothesen bestehen, waren Informationen über die Differenzierung der Proteine im Schalendrüsensekret aus dem zugänglichen Schrifttum überhaupt nicht erhältlich.

Außer der Besprechung einiger weniger, die Thematik dieser Arbeit direkt betreffender Originalpublikationen soll in diesem Kapitel zunächst ein kurzer Überblick über Bau und Funktion des Legeapparates beim Huhn sowie über die Zusammensetzung des Eies und dessen Schale vermittelt werden. Auf diese Weise soll versucht werden, die Problemstellung dieser Arbeit in den Gesamtkomplex "Eischalenbildung" einzuordnen und mögliche Zusammenhänge aufzuzeigen.

A. Kurzer Überblick über Bau und Funktion des Legeapparates beim Huhn sowie über die Bestandteile des Eiklars und die Bildung der Eischale

1. Morphologische und funktionelle Untergliederung des Legeapparates

Aus vergleichend anatomischen Gründen schlagen DIAMANTSTEIN und SCHLÜNS (1964) vor, dem im deutschen Schrifttum verwendeten Begriff "Legedarm" der in der angelsächsischen Literatur üblichen

Bezeichnung "Ovidukt" den Vorzug zu geben. Der Lege-
darm des Huhnes gliedert sich in 5 morphologisch und
funktionell verschiedene Abschnitte.

Nach der Ovulation wird die Dotterkugel zunächst vom
Infundibulum aufgenommen und gelangt von dort in das
der Ampulla tubae des Säugetieres entsprechende Magnum,
wo innerhalb von etwa 3 Stunden das Eiklar um das
Dotter herum abgesondert wird (WARREN und SCOTT, 1935).

Nach Bildung der als äußere und innere Membran bezeich-
neten Eihäute im Isthmus, gelangt das Ei in die Scha-
lendrüse, die in der Literatur auch als Uterus be-
zeichnet wird, obwohl funktionell keine Beziehung zum
Uterus des Säugetieres besteht. In 17 - 20 Stunden
(WARREN und SCOTT, 1935) erfolgt hier unter Dehnung der
Eihäute eine Verdoppelung des Eivolumens (SCOTT, HUGHES
und WARREN, 1937) durch Aufnahme von Wasser und Elektro-
lyten; außerdem wird hier die Eischale gebildet.

Die Schalendrüse ist etwa 12 cm lang. Ihre Wand ist mit
einer stärkeren Muskelschicht versehen als die übrigen
Abschnitte des Legedarmes (STURKIE, 1965). Sie enthält
zahlreiche tubuläre und einzellige Drüsen, die Wasser
und Elektrolyte sowie die Baustoffe für die Eischale
sezernieren.

Das fertige Ei wird über Vagina und Kloake abgelegt.

2. Die Bestandteile des Eiklars

Das Eiklar, das in 4 Schichten von unterschiedlicher
Viskosität die Dotterkugel umgibt, enthält im Durch-

schnitt 10,6% Protein (ROMANOFF und ROMANOFF, 1949). Dieses Protein kann in Ovalbumin, Conalbumin, Ovomucoid, Ovoglobulin, Lysozym und Ovomucin differenziert werden (WALDSCHMIDT-LEITZ, 1957; STUTE, 1960).

Über die quantitative Verteilung dieser Eiweißkörper liegen verschiedene Angaben vor, die STUTE (1960) zusammengestellt hat. Mit Hilfe der Papierelektrophorese untersuchte dieser Autor 100 Frischeier und kam dabei im Mittel auf folgende prozentuale Verteilung:

Ovalbumin			Ovomucoid und	Conalbumin	Lysozym
A ₁	A ₂	A ₃	Ovoglobulin		
39,9%	12,9%	4,8%	14,8%	19,7%	5,1%

Da im Rahmen dieser Arbeit vor allem Ovalbumin und Conalbumin von Interesse sind, soll hier nur auf diese Proteine näher eingegangen werden.

Ovalbumin ist ein Glykoprotein mit einer prosthetischen Gruppe, das auf dem Elektropherogramm im Bereich des Albumin liegt und wie dieses in Wasser und verdünnten Salzlösungen löslich ist. Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,6 - 4,8; das Molekulargewicht beträgt 45.000.

Elektrophoretisch sind 3 Fraktionen zu trennen (STUTE, 1960).

Das Conalbumin verhält sich dagegen bei der Elektrophorese und hinsichtlich der Löslichkeit eher wie ein Globulin. Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,8 - 6,0; das Molekulargewicht beträgt 87.000.

Elektrophoretisch sind nach STUTE (1960) und LUSH (1961) 2 Fraktionen darstellbar, während CROIZIER und SAUVEUR (1967) 3 - 4 Fraktionen nachwiesen.

3. Zur Eigenschaft des Eiklarproteins Conalbumin, Eisen und Bicarbonat zu binden

Seit langem ist bekannt, daß Conalbumin wie Transferrin die Fähigkeit besitzt, Eisen zu binden.

SCHADE et al. (1949) wiesen nach, daß CO_2 notwendig ist, um diese Bindung zu ermöglichen. WARNER und WEBER (1953) bestätigten dies durch den Nachweis, daß ein Molekül Transferrin oder Conalbumin 2 Atome Eisen, Kupfer oder Zink und 2 Bicarbonationen als Komplex binden kann. Mit der Einschränkung, daß für die Bindung von Kupfer an das Protein die Mitwirkung von Bicarbonat nicht notwendig ist, kommen auch WINDLE et al. (1963) zu diesem Ergebnis.

Durch spektrophotometrische Untersuchungen fand WOODWORTH (1966), daß entweder zwei oder gar kein Metallatom an das Conalbumin oder Transferrin gebunden werden.

SCHADE und REINHARDT untersuchten 1966 erneut dieses Problem und stellten mit radiochemischen Methoden fest, daß 2 Mol CO_2 und 2 Tom Eisen pro Mol Transferrin oder Conalbumin als Komplex gebunden werden können. Es erwies sich allerdings, daß der Bicarbonatanteil um das 10 - 100fache schneller aus dem Komplex dissoziierte als das Eisen.

Der genaue biochemische Mechanismus der Bildung und Auflösung des Komplexes aus Protein, Metallatomen und Bicarbonationen ist heute noch weitgehend ungeklärt (HRISTIC, 1969).

4. Der Aufbau der Eischale

In der Schalendrüse beginnt auf der Oberfläche der äußeren Eihaut die Eischalenbildung mit dem Aufbau von zwei organischen Schichten, den Mamillen und der Matrix, die hauptsächlich aus Proteinen und sauren Mucopolysacchariden bestehen (ROMANOFF und ROMANOFF, 1949; SIMKISS und TYLER, 1957; COOKE und BAICH, 1970). Grundlage der Mamillen ist ein kugelförmiger Kern (Primärsphärit) aus organischer Substanz, an dessen Außenfläche die erste Kristallbildung erfolgt. Der Mamillenschicht folgt nach außen hin die Spongiosa. An der feinverzweigten, fibrillären Netzwerk, dessen Fasern sich von denen der äußeren Eihaut deutlich in Länge und Durchmesser unterscheiden (SIMONS und WIERTZ, 1963, 1970), nimmt die Kristallbildung der anorganischen Bestandteile der Eischale ihren Ausgang. Die Kristalle wachsen zunächst um die Mamillen herum als keilförmige Kugelsektoren, die infolge gegenseitiger Wachstumsbehinderungen in der spongiösen Schicht als Säulen weiterwachsen (SCHMIDT, 1962, 1966).

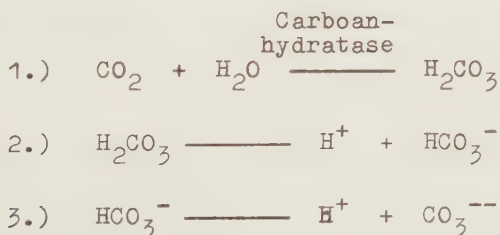
Der anorganische Anteil der Eischale besteht neben geringen Mengen Magnesiumcarbonat (0,84%) und Tricalciumphosphat (0,73%) im wesentlichen aus Calciumcarbonat. Während der Eischalenmineralisation werden im Durchschnitt 5 g CaCO_3 in die organische Substanz eingelagert, was einer Menge von 2 g Calcium und 3 g Carbonat entspricht.

Das Calcium wird während der Eischalenmineralisierung dem Blut entnommen (TAYLOR und HERTELENDY, 1961) und in das Lumen der Schalendrüse sezerniert. Durch resorbiertes Nahrungscalcium und Mobilisierung von Skelettcalcium wird der Ca-Gehalt des Blutes weitgehend konstant gehalten. Nur in geringer Menge wird Calcium in der Mucosa der

Schalendrüse angereichert. SCHRAER und SCHRAER (1970) wiesen durch Anwendung einer autoradiographischen Methode nach, daß der Calciumgehalt in der Schalendrüse am höchsten ($28,5 \pm 4,0$ mg Ca/g Asche) ist, wenn sich das Ei im Infundibulum befindet und am niedrigsten ($16,0 \pm 1,2$ mg Ca/g Asche), wenn es die Schalendrüse erreicht hat.

Weitgehend ungeklärt ist heute noch, wie die Carbonat- bzw. Bicarbonationen an den Ort der Eischalenmineralisation gelangen.

GUTOWSKA und MITCHELL (1945) vermuteten, daß zwei Bicarbonationen des Blutes in den Uteruszellen zu Kohlensäure und Carbonationen zerlegt werden. Die so gebildeten Carbonationen sollen dann in das Uteruslumen sezerniert werden, während die Kohlensäure durch das in der Schalendrüse vorhandene Enzym Carboanhydratase (COMMON, 1941) zu Wasser und Kohlendioxyd disproportioniert wird. SIMKISS (1961) vertritt die Auffassung, daß die Bicarbonationen nicht aus dem Blute stammen, sondern erst in den Uteruszellen gebildet werden. Nach dieser Theorie soll unter Einfluß der Carboanhydratase das als Stoffwechselprodukt in den Uteruszellen anfallende CO_2 zu Kohlensäure hydratisiert werden. Nach zweimaliger Abspaltung eines Protons soll dann jeweils ein Carbonation ins Uteruslumen sezerniert werden.



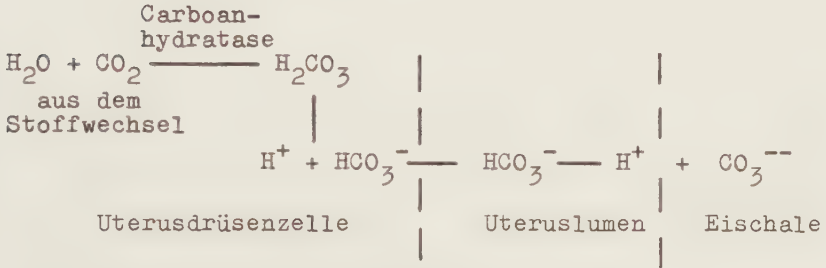
DIAMANTSTEIN (1966) modifiziert diese These insofern, als er vermutet, daß die Bildung der Carbonationen erst im Uteruslumen erfolgt, in das die Bicarbonationen sezerniert werden.

Nach i.v. Injektion von ^{14}C -markiertem Bicarbonat ermittelten LÖRCHER und HODGES (1967), daß die arterio-venöse Differenz des ^{14}C -Gehaltes im Blut der Schalendrüse keine signifikanten Unterschiede aufwies zwischen Hennen während der Eischalenmineralisation und solchen ohne Ei im Uterus. Weiter erwies sich, daß nur 1 - 3% der als Bicarbonat verabreichten ^{14}C -Aktivität in die Schale eingebaut wurden. KUTAS et al. (1970) bestätigten dieses Ergebnis durch den Nachweis, daß während der Eischalenmineralisation keine signifikanten arterio-venösen Differenzen des pH-Wertes und des CO_2 -Gehaltes im Blut der Schalendrüse bestehen.

Weiter ermittelten LÖRCHER, ZSCHEILE und BRONSCH (1970) und ZSCHEILE (1969) die Einbauraten von ^{47}Ca und ^{14}C in die Eischale nach kontinuierlicher Infusion beider Nuklide bei deren Konstanz im Blut. Da das Ca:Bicarbonat-Verhältnis im Hühnerserum etwa 1:5 beträgt, wäre bei konstanter ^{47}Ca - und ^{14}C -Bicarbonat-Aktivität im Blut nach der Theorie von GUTOWSKA und MITCHELL (1945) zu erwarten, daß auf 5 Teile ^{47}Ca in der Schale mindestens 1 Teil ^{14}C -Bicarbonat entfällt. Das ^{47}Ca : ^{14}C -Verhältnis betrug jedoch 25 - 30 : 1.

Alle diese Ergebnisse sind nicht mit der Theorie von GUTOWSKA und MITCHELL in Einklang zu bringen, so daß bis zu einer experimentellen Klärung dieses Problems der Hypothese von DIAMANTSTEIN (1966) durch einen indirekten Beweis die größere Wahrscheinlichkeit zukommt.

Schematische Darstellung der Hypothese von DIAMANTSTEIN
(1965) über die Bicarbonatbereitstellung für die Ei-
schalenmineralisation



Wie das Proton des Bicarbonates abgespalten wird und wie
das Carbonation zum Ort der Mineralisation gelangt, ist
heute noch ungeklärt.

B. Das Schalendrüsensekret

1. Zur Zusammensetzung und Funktion

Das Sekret der Schalendrüse ist unseres Wissens bisher nur von vier Arbeitsgruppen auf seine Bestandteile hin untersucht worden.

BEADLE et al. (1938) analysierten als erste das Sekret während der beginnenden Verkalkung des Eies, der "plumping phase". Erst 1967 untersuchten EL JACK und LAKE wieder Schalendrüsensekretproben, und zwar während der "plumping phase" und der "oviposition phase" (etwa 2 Stunden vor der Eiablage). Weitere Ergebnisse liegen von MONGIN und SAUVEUR (1970), die die anorganischen Bestandteile des Sekretes in allen Phasen der Eischalenmineralisierung untersuchten, und von SOLOMON (1971) vor. In dieser letzten Arbeit wurde nur der Calcium- und Magnesiumanteil des Schalendrüsensekretes ermittelt.

In Tabelle 1 sind die in den genannten Publikationen gefundenen Werte für die anorganischen Bestandteile des Schalendrüsensekretes zusammengestellt. Während die Angaben für Natrium, Kalium und Chlor weitgehend übereinstimmen, wurden für Calcium und Magnesium sehr unterschiedliche Werte gefunden.

Nach Ansicht von BEADLE kann das Schalendrüsensekret nicht den Transport des Calciums von den Uteruszellen zur Eischale bewerkstelligen, da aufgrund der ermittelten Ca-Konzentration für eine Eischale in 20 Stunden 10 l sekretiert werden müßten.

Eine Analyse der Ionenzusammensetzung des Schalendrüsensekretes läßt jedoch nur einen Rückschluß auf die augen-

Tabelle 1

Die anorganischen Bestandteile im Schalendrüsensekret
(Alle Werte in mMol/l)

Na		K		Ca		Mg		Cl		
I	III	I	III	I	III	I	III	I	III	
111,0	-	25,0	-	4,7	-	0,4	-	64,8	-	BEADIE et al. (1938)
139,1 + 4,6 ±	42,8 + 2,1 ±	15,9 + 0,8 ±	75,0 + 3,0 ±	14,1 + 0,7 ±	25,8 + 3,4 ±	1,36 + 0,2 ±	10,0 + 1,2 ±	79,9 + 1,7 ±	63,4 + 3,9 ±	EL JACK und LAKE (1967)
143,9	48,0	13,5	59,6	3,3	3,6	-	-	67,2	45,8	MONGIN und SAUVEUR (1970)
-	-	-	-	0,75 + 0,08 ±	0,97 + 0,06 ±	1,1 + 0,08 ±	1,0 + 0,1 ±	-	-	SOLOMON (1971)

I = "plumping state" (13 - 18 Stunden vor Eiablage, Beginn der Eischalenmineralisation

III = "oviposition state" (ca. 2 Stunden vor Eiablage

blicklich vorhandene Calcium- bzw. Bicarbonatmenge zu und gestattet keine Aussage über deren Gesamtumsatz.

DIAMANTSTEIN (1965) stellte fest, daß aus einer Lösung, die nach den Angaben von BEADLE hergestellt wurde, auch nach 14-tägigem Stehen unter Luftabschluß kein Calciumcarbonat ausfiel. Als Voraussetzung der Eischalenmineralisation postulierte dieser Autor daher eine lokale Anreicherung der Calcium- oder Carbonationenkonzentration in der Matrix bzw. in den Mamillen oder eine pH-Verschiebung in den alkalischen Bereich, was einer Erhöhung der Carbonationenkonzentration gleichkommen würde.

Bei der rechnerischen Überprüfung ergab sich, daß DIAMANTSTEIN sowohl die Calcium-, als auch die Bicarbonatkonzentration um eine Zehnerpotenz zu niedrig angesetzt hatte. Mischt man bei einem dem Uterussekret entsprechenden pH-Wert von 7,8 die von BEADLE angegebenen Ca^{2+} (7×10^{-3})* und HCO_3^- (6×10^{-2})* Lösungen, so bildet sich unter Luftabschluß schon nach wenigen Minuten ein CaCO_3 -Niederschlag.

Danach entfallen die Gründe, die DIAMANTSTEIN zur Aufstellung seiner oben genannten Bedingungen für die Eischalenmineralisation veranlaßten.

2. Zur Herkunft der Proteine im Schalendrüsensekret

Für den Proteingehalt im Schalendrüsensekret des Huhnes wird in der gesichteten Literatur nur von BEADLE et al. (1938) eine quantitative Angabe gemacht. Danach soll in diesem Sekret während der "plumping phase" Eiweiß in einer Menge von durchschnittlich 0,4 g/100 ml enthalten sein.

* Angaben in Mol/l

Über die Art und Herkunft der Eiweißkörper, die bisher experimentell nicht differenziert und identifiziert wurden, liegen lediglich folgende Hypothesen vor.

SCOTT et al. (1937) vermuten, daß diese Proteine entweder zum Aufbau der Matrix von der Schalendrüse produziert werden oder aber daß es sich um Eiklar aus den kranialen Abschnitten des Legedarms handelt.

Ebenfalls als Eiklarproteine, die während der "plumping phase" durch die Eihäute hindurch ins Uteruslumen gelangen sollen, deuten BEADLE et al. (1938) die geringe Proteinmenge im Schalendrüsensekret. Zur Untermauerung ihrer These stellte diese Arbeitsgruppe folgenden Versuch zur Prüfung der Proteindurchlässigkeit der Eihäute an:

Noch nicht verkalkte, sorgfältig gewaschene Eier sowie mit sorgfältig gewaschenen Eihäuten verschlossene Gläser, die Eiklar enthielten, wurden in Ringerlösung von 38°C eingetaucht. In beiden Fällen war nach 3 Stunden soviel Protein durch die Membran diffundiert, daß mit Trichloressigsäure eine Fällung erzielt wurde.

Im Kontrollversuch wurden lediglich gewaschene Eihäute 24 Std. in Ringerlösung gelegt, in der nach Zugabe von Trichloressigsäure keine Eiweißfällung erfolgte. Dies wurde als Beweis gewertet, daß der Eiweißniederschlag in den oben beschriebenen Versuchen nicht von den Eihäuten stammen konnte.

3. Methoden der Sekretentnahme

Die Entnahme des Schalendrüsensekretes bereitet insofern Schwierigkeiten, als leicht eine Kontamination mit Harn oder Blut eintreten kann, wodurch Analysen des Sekretes

verfälscht werden. Außerdem ist es nicht immer einfach, genügend große Mengen zu gewinnen.

Im folgenden sind bisher beschriebene Methoden aufgeführt.

- a. BEADLE et al. (1938) wandten folgende Verfahren an:
Nach Entfernen des Eies durch digitale Manipulation wurde zusammen mit einem Gummikatheter ($\varnothing$ 6 - 10 mm) ein aufblasbarer Ballon in die Schalendrüse eingeführt, um den Druck des Eies auf die Organwand zu imitieren. Hierbei kam es allerdings durch Läsionen der Schleimhaut häufig zu Verunreinigungen mit Blut.
Nach unseren Erfahrungen erwies es sich meist als nicht möglich, dünnschalige Eier ohne deren Beschädigung aus der Schalendrüse zu entfernen.
- b. Außerdem erprobte dieser Verfasser eine operative Methode.
Nach Anästhesie des Huhnes mit 0,7 ml Nembutal i.v. wurde das Abdomen geöffnet und ein schmaler Einschnitt in die Uteruswand gesetzt, durch den mittels eines Katheters Sekret entnommen wurde. Durch Anlage von Klammern wurden Blutungen ins Lumen der Schalendrüse weitgehend verhindert.
- c. HOOVER und SMITH (1958) entzogen den Tieren drei Stunden vor Sekretentnahme das Futter, um eine Verschmutzung der Kloake möglichst zu verhindern. Nach Entfernen des Eies durch Massage des Abdomens wurde den Hennen ein Gummi- oder Glaskatheter, der am vorderen Ende eiförmig ausgebuchtet war, in die Schalendrüse eingeführt. Bei Verwendung größerer Katheter (vordere Ausbuchtung etwa Eiergröße) kam es oft zu Blutungen, während mit kleineren Kathetern, die mehrere Stunden in der Schalendrüse verblieben, oft zu wenig Sekret aufgefangen wurde.

- d. EL JACK und LAKE (1967) verwendeten wieder eine operative Methode. Nach Betäubung des Huhnes mit 0,5 - 0,6 ml Nembutal i.v. wurde die Bauchhöhle so geöffnet, daß der Operateur mit zwei Fingern eindringen und das Ei durch Massage der Schalendrüse aus dem Legeapparat herausdrücken konnte. An der gereinigten Kloake wurde das Ei und das nachfließende Sekret entnommen. Diese Operation, bei der jeweils 0,5 - 1,7 ml Sekret gewonnen wurde, konnte am selben Tier mehrmals wiederholt werden.
- e. BURKE und OGASAWARA (1969) entnahmen Sekret von der Kloake her mit Hilfe einer Enzympipette. Allerdings wurden hierbei nur wenige Mikroliter gewonnen.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

III. ARBEITSPLAN

Wie aus der Literaturübersicht hervorgeht, sind bisher kaum Untersuchungen über die Zusammensetzung des Schalendrüsensekretes durchgeführt worden. Über die Proteine dieses Sekretes liegt sogar nur eine quantitative Angabe vor.

Nach Entwicklung einer einfachen Methode zur Gewinnung des Schalendrüsensekretes soll zunächst quantitativ dessen Eiweißgehalt in verschiedenen Stadien der Eischalenmineralisation ermittelt werden.

Weiter soll dann nach qualitativer und quantitativer Untersuchung der Proteine durch Elektrophorese versucht werden, diese Eiweißfraktionen durch Vergleich mit bekannten Proteinen zu identifizieren.

Es soll vor allem geklärt werden, ob Eiklarproteine im Schalendrüsensekret vorkommen, wie von BEADLE et al. (1938) behauptet wird.

Falls sich dies bestätigt, soll durch Markierung des Sekretes mit radioaktivem Eisen (^{59}Fe) und Bicarbonat ($\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$) geprüft werden, ob das Eiklarprotein Conalbumin, das wie Transferrin die Fähigkeit hat, pro Mol zwei Mol Bicarbonat-Ionen und zwei Mol Eisen zu binden, im Schalendrüsensekret vorkommt.

Sodann soll an isoliertes Conalbumin und Transferrin ^{14}C -markiertes Bicarbonat gebunden werden mit dem Ziel, eine möglichst hohe spezifische Aktivität von protein-gebundenem $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ zu erreichen.

Schließlich soll zur Klärung der Frage, ob Proteine möglicherweise am Transport des Bicarbonates bei der Bildung der Eischale beteiligt sind, im Tierversuch proteingebundenes $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ und im Vergleich dazu freies gepuffertes $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ direkt in die Schalendrüse infundiert und die Einbaurrate von ^{14}C in die Eischale ermittelt werden.

IV. MATERIAL UND METHODIK

A. Versuchstiere

1. Auswahl der Versuchstiere

Für die Gewinnung von Schalendrüsensekretproben wurden 50 HNL-Legehennen herangezogen, die sich in der dritten Legeperiode befanden.

Zur Bestimmung des in die Eischale eingebauten ^{14}C -Anteils nach Infusion von ^{14}C -Bicarbonat in die Schalendrüse wurden 24 HNL-Legehennen, die sich im Alter von etwa 15 Monaten am Ende der ersten Legeperiode befanden, nach der Legeleistung aus einer Population von 150 Legehennen ausgewählt.

2. Haltung und Fütterung

Die Hennen wurden einzeln in Batterien gehalten und konnten Futter und Wasser nach Belieben aufnehmen. Das verabreichte Legehennenalleinfutter entsprach den Bestimmungen zur Führung des DLG-Gütezeichens und enthielt nach der Register-Analyse folgende wertbestimmende Anteile:

18,1 %	Rohprotein	2,8 %	Ca
5,1 %	Fett	0,8 %	P
4,2 %	Rohfaser	0,16 %	Na
11,6 %	Asche		

Ein automatisch geregeltes Lichtprogramm gewährleistete täglich von 6.00 bis 24.00 Uhr eine einheitliche Beleuchtung der Versuchstiere.

B. Entnahme von Schalendrüsensekret

Da während der Versuche häufig auch nachts Proben genommen werden mußten, wurde auf operative Methoden zur Schalendrüsensekretgewinnung verzichtet, um von Hilfspersonen unabhängig zu sein.

Zur Fixierung der Hennen bei der Sekretentnahme bauten wir ein Gestell nach der Beschreibung von HOOVER und SMITH (1958), auf dem die Tiere festgebunden wurden.

Von mehreren getesteten Kathetern eignete sich zur Probenentnahme am besten ein weicher Plastikkatheter mit seitlicher Öffnung mit einer Länge von 20 cm und einem Durchmesser von 0,5 cm (Hersteller: Fa. Ruesch, Typ CH 14).

Die Sekretentnahme, die etwa 10 Min. pro Tier dauerte, wurde wie folgt vorgenommen:

Durch rektale Untersuchung wurde geprüft, ob sich ein Ei in der Schalendrüse befand und welches Stadium der Verkalkung vorlag. Nach Fixierung der Henne wurde die Kloake mit weichem Zellstoff sorgfältig gereinigt. Das Einführen des Katheters durch das möglichst weit nach kaudal verlagerte Orificium externum muß unter digitaler Kontrolle geschehen, da sonst sehr leicht Schleimhautläsionen gesetzt werden. Mit der Fingerkuppe kann nun recht genau das Stadium der Verkalkung bestimmt werden.

Es wurde eine Einteilung in drei Abschnitte der Mineralisation vorgenommen:

Stadium I: Dieser Abschnitt entspricht der "plumping phase"; das Ei ist noch eindrückbar und es ist allenfalls eine leicht raue Oberfläche festzustellen.

(ca. 13 - 18 Stunden vor Eiablage)

Stadium II: Die bereits teilmineralisierte Schale hat die Beschaffenheit vergleichbar mit einer dünnen Eisdecke und ist leicht eindrückbar.
(ca. 11 - 14 Stunden vor Eiablage)

Stadium III: Dieses Stadium entspricht der "oviposition phase"; die Eischale ist fest und ihre Oberfläche ist mehr oder weniger glatt.
(11 Stunden vor bis zur Eiablage)

Nach Zurücknahme des Fingers aus der Schalendrüse wurde die Kloake mit Zellstoff austamponiert, um eine Verschmutzung des Katheters zu vermeiden.

Das Sekret lief bei den verwendeten Kathetern von selbst ab. Ein Ansaugen der Flüssigkeit erwies sich als unzweckmäßig, da dadurch die Schleimhaut der Schalendrüse mit angesogen wurde und es häufig zu Blutungen und Epithelabschilferungen kam. Innerhalb weniger Minuten wurden so etwa 1 - 3 ml Sekret gewonnen.

Eine Katheterisierung über einen längeren Zeitraum erwies sich als unzweckmäßig, da die Tiere dann oft heftig im abdominalen Bereich preßten, um sich von dem "Fremdkörper" zu befreien. Hierdurch entstanden wiederum leicht Blutungen, wodurch die Proben für eine Proteinbestimmung unbrauchbar wurden.

C. Zur quantitativen Proteinbestimmung

Die N-Bestimmung wurde nach der Methode von KJELDAHL für Mikromengen mit der Parnas-Wagner-Apparatur (Fa. Büchi) durchgeführt. Bei der zu erwartenden geringen Menge Protein wurde der Ammoniak gegen $1/100$ n HCL titriert. Bei dieser Methode entspricht eine Menge von 1 ml $1/100$ n HCL 0,875 mg Protein. Die Menge der verarbeiteten Sekretproben betrug zwischen 1,5 - 3,0 ml; die ermittelte Proteinmenge wurde in g/100 ml umgerechnet.

D. Untersuchungen über die Eigenschaften der Proteinfractionen im Schalendrüsensekret

1. Elektrophoretische Darstellung und Auswertung

Die elektrophoretische Untersuchung des Schalendrüsensekretes bereitete anfangs große Schwierigkeit, denn einmal war die Proteinkonzentration sehr gering und zweitens fiel aus vielen Proben bereits bald nach der Entnahme Eiweiß aus, das bei der Elektrophorese an der Auftragsstelle liegenblieb und die Auswertung erschwerte.

a) Konzentrierung des Schalendrüsensekretes

Die Konzentrierung des Sekretes gelang am besten durch Dialyse mit Kollodiumhülsen aus Cellulosenitrat (Fa. Sartorius, Nr. SM 13200), die in eine Haltevorrichtung mit Standgefäß eingebracht wurden. Der Unterdruck wurde mit einer Wasserstrahlpumpe erzeugt. Vor der Einengung auf etwa $1/10$ des Volumens wurde das Sekret durch ein Filter (Fa. Sartorius, Nr. SM 11307, Porengröße $0,2\mu$, Ø 30 mm) von zelligen Bestandteilen befreit.

b) Durchführung der Elektrophorese

Für die Elektrophorese, durchgeführt nach einer modifizierten Methode von DEL CAMPO (1968), wurde eine Multiphoresekammer (Fa. Serva, Nr. 91043) verwendet. Die Gleichspannung lieferte eine Multiphorese-Gleichrichter IV (Fa. Serva, Nr. 91036). Es wurden Elektrophoresestreifen aus Celluloseacetat verwendet (Fa. Chemetron, Cello-gel RS "wedge" und "rectangular", 5 cm x 24 cm). Da die Streifen für die Multiphoresekammer zu lang waren, wurden sie auf eine Länge von 20 cm gekürzt.

Mit einem Semimikroapplikator (Fa. Chemetron, 1,5/ μ Auftragskapazität) wurden auf die gekennzeichneten Streifen je 2 bis 3 Proben von je 3 - 4,5/ μ aufgetragen. Als Puffer kam ein Tris-Glycin-Puffer mit dem pH von 9,5 zur Anwendung (14,1 g Tris + 22,6 g Glycin auf 1 l Aquabidest.). Die Laufzeit betrug eine Stunde bei 280 Volt.

c) Färbung und Transparentmachung der Cellogelstreifen

Zum Färben der Streifen wurde neben Amido-Schwarz und Lissamin-Grün vor allem Ponceau S verwendet.

(0,5 g Ponceau in 100 ml 5%iger Essigsäure;

Färbedauer: 5 Min.)

Entfärbt und aufbewahrt wurden sie in 5%iger Essigsäure.

Einige mit Ponceau gefärbte Streifen wurden zur Intensivierung der Mikrofraktionen mit Nigrosin nachgefärbt.

(6 mg Nigrosin in 200 ml 5%iger Essigsäure;

Färbedauer: 12 Stunden)

Entfärbt wurde durch mehrfaches Spülen mit Wasser.

Nach der Anleitung der Fa. Chemetron wurden die Streifen transparent gemacht:

1. Dehydrieren in Methanol; 30 Sek.
2. Einlegen des Streifens in eine Mischung aus Methanol, Eisessig und Glycerin (85:14:1); 1 Min.
3. Trocknung des Streifens auf einer Glasplatte bei 60°C; 4 - 5 Min.

Die trockenen, transparenten Streifen wurden auf der Glasplatte an den schmalen Enden mit Klebestreifen fixiert.

d) Densitometrische Auswertung

Die Auswertung der transparenten Streifen erfolgte mit einem Densitometer der Fa. Zeiss, Gerät PMQ II, an das ein Schreiber mit Integrator der Fa. Kontron GmbH (Hi-Speed Recorder 402) angeschlossen war.

Einstellung: Densitometer: Wellenbereich 500 nm
Blende 0,4

Integrator: log 0,5

Auf diese Weise wurden 15 Elektropherogramme von insgesamt 14 verschiedenen Schalendrüsensekretproben und jeweils einem bekannten Testprotein ausgewertet. Gegenüber den Originalen auf dem Celloelstreifen wurden bei der densitometrischen Auswertung die Laufstrecken um den Faktor 6,7 gedehnt. Mit Hilfe der Integatoreinheiten der Elektropherogramme wurde der prozentuale Anteil der Proteinfraktionen bestimmt.

2. Zur Identifizierung der Proteine

Um die elektrophoretisch dargestellten Proteine des Schalendrüsensekretes identifizieren zu können, wurden

jeweils auf demselben Cellogelelstreifen Standardproteine aufgetragen. Es handelte sich um:

Chicken-Serumalbumin	(Koch & Light, Lab. 9073)
Ovalbumin	(Boehringer Nr. 15967)
Humantransferrin TFE 04	(Behringwerke AG., Nr. 62 G)
Rindertransferrin	(Koch & Light, Lab. 5360 t)
Chicken-Conalbumin	(Mann Research Laboratories Nr. NV 4764)

Außerdem wurde Eiklar - homogenisiert und 1:5 verdünnt mit Ringerlösung - als bekanntes Proteingemisch zum Vergleich herangezogen.

Die Strecken von der Auftragsstelle bis zum Gipfel der einzelnen Proteinfractionen des Schalendrüsensekretes wurden mit den Strecken der parallel gelaufenen bekannten Proteine verglichen. In Anlehnung an die Methode von SCHMITT (1968) wurde bei der Bestimmung der einzelnen Proteine die Strecke von der Auftragsstelle bis zum Gipfel des Serumalbuminpeaks gleich 100 gesetzt. Der Quotient aus der Wanderstrecke der zu identifizierenden Proteine und der des Serumalbumins ergibt dann deren relative Wandergeschwindigkeit, die als R-Wert bezeichnet wird.

3. Bestimmung der Bindefähigkeit der Proteine für ^{59}Fe und H^{14}CO_2 -----3-

Aus der Literatur ist bekannt, daß Conalbumin die Eigenschaft hat, Eisen und Bicarbonat zu binden. Da nach Auswertung der Elektropherogramme die Vermutung bestand, daß Conalbumin im Uterussekret vorkommt, wurde dessen Bindungsvermögen in dieser Hinsicht untersucht. Hierzu wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet.

a) Elektrophorese von ^{59}Fe -markiertem Schalendrüsensekret

α) Markierung mit ^{59}Fe

Zu 3 ml Schalendrüsensekret (Stadium I) wurden $5/\mu\text{Ci}$ ^{59}Fe ¹⁾ gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 40°C wurde das Sekret mit einer Kollodiumhülle auf ein Volumen von 0,1 ml eingengt.

β) Durchführung der Elektrophorese

Von dem eingengten, markierten Sekret wurden auf einen Cellogel-Streifen zwei Proben von je ca. $15/\mu\text{l}$ aufgetragen. Nach beendeter Elektrophorese - durchgeführt wie in Kapitel D.1.b. beschrieben - wurde der Cellogelstreifen der Länge nach in zwei Teile geschnitten. Während der eine Teil mit Ponceau S gefärbt wurde, zerlegten wir den anderen in Anlehnung an eine Methode von AIZETMÜLLER u.a. (1966) in je 5 mm breite Querstreifen. Nach Ermittlung der ^{59}Fe -Aktivität der einzelnen Querstreifen wurden die gefundenen Werte den entsprechenden Abschnitten der gefärbten Gegenprobe zugeordnet, um damit die auf die einzelnen Proteinfractionen entfallende ^{59}Fe -Aktivität zu bestimmen.

γ) ^{59}Fe -Gamma-Aktivitätsmessung

Die Ermittlung der ^{59}Fe -Gamma-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines NaJ-Bohrlochkristalls in Verbindung mit einem Auto-Gamma-Spektrometer (Packard Instrument Comp.

1) Bezugsquelle für ^{59}Fe : The Radiochemical Centre,
Amersham, England
Konzentration der Radioaktivität: 1 mCi in 1 ml Eisen-
chloridlösung
Spezifische Aktivität: 15,2 mCi/mg Fe

Modell 5018), dessen Diskriminatoren für einen Energiebereich von 0,1 - 1,5 MeV eingestellt waren.

Verstärkung: 10 %

Fenstereinstellung: 50 - 750 Teilstriche

Damit wurden die alle zwischen 0,19 und 1,29 MeV liegenden Photopeaks der Gammastrahlung des ^{59}Fe erfaßt.

b) Säulenchromatographie von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ -markiertem Schalendrüsensekret

Der Nachweis einer Bindung von ^{14}C -Bicarbonat an Schalendrüsensekretproteine mit einer elektrophoretischen Methode gelang nicht, da sich die ermittelten Aktivitätswerte nicht signifikant vom Nulleffekt unterschieden. Es wurde daher versucht, durch ein säulenchromatographisches Verfahren die Bindefähigkeit dieser Proteine für ^{14}C -Bicarbonat aufzuzeigen.

α) Markierung von Schalendrüsensekret mit ^{14}C -Bicarbonat

Für diesen Versuch wurden 10 ml Schalendrüsensekret (Stadium III) von verschiedenen Hennen durch Dialyse mit Kollodiumhülsen auf ein Volumen von 2,1 ml eingengt.

Um möglicherweise eine Aussage über die Bindekapazität der Proteine des Sekretes machen zu können, wurde folgende Überschlagsrechnung durchgeführt:

Nach unseren quantitativen Proteinbestimmungen sind in 10 ml Schalendrüsensekret (Stadium III) etwa 10 mg Eiweiß enthalten. Unter Berücksichtigung unserer elektrophoretischen Untersuchungen ist etwa 20 % dieser Menge eine im Conalbuminbereich liegende

Proteinfraktion. Demnach sind in 10 ml Sekret ca. 2 mg Conalbumin enthalten.

Nach den Angaben in der Literatur (siehe Seite 5) kann Conalbumin maximal pro Mol zwei Mol Bicarbonat und zwei Tom Eisen als Komplex binden.

Ansatz: 2 mg Conalbumin = 0,022/ μ Mol Conalbumin
0,022/ μ Mol Conalbumin binden 0,044/ μ Mol HCO_3^-
und 0,044/ μ Tom Eisen

Dem Schalendrüsensekret wurde nun ^{14}C -Natriumbicarbonat¹⁾ und stabiles Eisen in einer Menge zugesetzt, die dem ca. 10-fachen dessen entsprach, was nach obenstehender Überschlagsrechnung von Conalbumin gebunden werden konnte.

0,022/ μ Mol Conalbumin + 0,48/ μ Mol $\text{Na}^{14}\text{CO}_3$ + 0,44/ μ Tom Fe

Entsprechend:

2,1 ml konzentriertes Schalendrüsensekret
+ 10,0/ μ l ^{14}C - NaHCO_3 -Lösung
+ 10,0/ μ l FeCl_2 -Lösung (enthaltend 12,3/ μ g Fe)

Nach Vermischung wurde diese Lösung mit Paraffinöl überschichtet und 3 Tage bei 40°C inkubiert.

1) Bezugsquelle für ^{14}C -Natriumbicarbonat: The Radiochemical Centre, Amersham, England

Konzentration der Radioaktivität: 1 mCi in 0,5 ml
Aqua dest.

Spezifische Aktivität: 42,4 mCi/mMol

β) Präparation der Säule

Verwendet wurde für diesen Versuch eine Säule von 500 mm Länge und einem Durchmesser von 18 mm.

Zur Herstellung des Trenngels wird Sephadex G-25 fine (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in einen Tris-Citrat-Puffer nach BARBER et al. (1963) mit einem pH-Wert von 7,9 eingebracht (20 g in 100 ml).

Ansatz des Puffers:

Lösung I: 1,21 g Tris + 8,76 g NaCl ad 1 l Aqua dest.

Lösung II: 2,01 g Citronensäure + 8,76 g NaCl
ad 1 l Aqua dest.

Die Lösungen I und II werden im Verhältnis 4:1 gemischt.

Nach einigen Stunden wird das gequollene Sephadex in die Säule bis zu einer Höhe von 350 mm eingefüllt, die damit für die Trennung von proteingebundenem und freiem Bicarbonat vorbereitet ist.

γ) Durchführung der Elution

Nach der Inkubation wurden 1,9 ml der Lösung in die Sephadexsäule einpipettiert. Nach dem vollständigen Eindringen der Lösung in das Gel wurde vorsichtig mit 1 ml Puffer nachgespült und aufgefüllt. Die Aufteilung des Eluates in Proben von je 0,5 ml geschah nach der Säulenpassage durch einen Fraktiometer (Fa. HAKO, Modell y-2).

δ) Messung der ^{14}C -Aktivität

Die Messung der ^{14}C -Aktivität in den einzelnen Fraktionen des Eluates erfolgte unter Anwendung der Flüssig-Scintillationsspektrometrie:

10 μl von jeder Probe wurden zu 15 ml Dioxan-Scintillator in ein Meßgläschen einpipettiert.

Der Scintillator besteht aus:

- 5,000 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)
- + 0,125 g 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol (Dimethyl-POPOP)
- + 100,000 g Naphthalin
- ad 1 l Dioxan

Die Probengläschen wurden verschraubt und anschließend leicht geschüttelt. Die Ermittlung der β -Aktivität erfolgte mit dem Tri-Carb-Scintillationsspektrometer (Packard Instrument Comp., Modell 4312), dessen Diskriminatoren A und B ($A = 50$, $B = 1000$ Teilstriche) bei einer Verstärkung von 5,5% so eingestellt waren, daß das gesamte Betaspektrum des ^{14}C ($E_{\text{max}} 0,159 \text{ MeV}$) erfaßt worden ist.

Als Bezugsgröße wurden in gleicher Weise Standardpräparate mit einer definierten Menge an ^{14}C -markiertem Bicarbonat hergestellt.

E. Ermittlung der Einlagerung von ^{14}C - in die Eischale nach Infusion von proteingebundenem und freiem ^{14}C -Bicarbonat in die Schalendrüse

Um zu klären, ob an Conalbumin oder Transferrin gebundenes ^{14}C -Bicarbonat nach direkter Infusion in die Schalendrüse in die Eischale eingelagert wird, war es erforderlich, Komplexbindungen aus den genannten Proteinen und ^{14}C -Bicarbonat herzustellen.

Da Conalbumin zur Zeit der Versuchsanstellung noch nicht über den Handel zu beschaffen war, wurde es durch Säulenchromatographie aus Hühnereiklar isoliert. Zum Auffinden des Conalbumins im fraktionierten Eluat wurde eine Markierung des Eiklars mit ^{59}Fe vorgenommen.

Durch Ermittlung der ^{59}Fe -Gamma-Aktivität der einzelnen Fraktionen gelang die Identifizierung der eisenbindenden Conalbuminfraktion, deren Reinheit durch elektrophoretische Darstellung überprüft wurde.

1. Herstellung von Conalbumin- bzw. Transferrin- ^{14}C -Bicarbonat-Komplexbindungen

Die Bindung des ^{14}C -Bicarbonats an Conalbumin, isoliert aus Eiklar und Transferrin (Transferrin bovine; Koch & Light, Nr. 5360 t), wurde analog der Markierung von Schalendrüsensekret mit ^{14}C -Bicarbonat durchgeführt (Siehe Kapitel D.3.b.α.).

Zu Proben von je 10 mg Eiweiß - gelöst in 3 ml Tris-Citrat-Puffer (pH 7,9) - wurden ^{14}C -markiertes Natriumbicarbonat und stabiles Eisen gegeben in einer Menge, die dem 10-fachen der maximalen Bindekapazität (Sättigungswert) der Proteine entsprach. Nach unterschied-

lichen Inkubationszeiten (2 Stunden bis 3 Tage) bei einer Temperatur von 40°C erfolgte die Trennung des proteingebundenen und des freien Bicarbonats durch Säulenchromatographie.

2. Verabreichung der ^{14}C -Bicarbonatlösungen und Bestimmung des ^{14}C -Einbaues in die Eischale

Um den Einbau von ^{14}C in die Eischale zu prüfen, erfolgte die Verabreichung von proteingebundenem ^{14}C -Bicarbonat an Legehennen (im Stadium I der Eischalenbildung) durch direkte Infusion in die Schalendrüse.

Zum Vergleich wurde anderen Hennen freies $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ mit der gleichen spezifischen Aktivität infundiert. Gelöst in Tris-Citrat-Puffer pH 7,9, blieb die Bicarbonatkonzentration einige Tage weitgehend konstant.

a) Durchführung der Infusion

Die Infusion der Lösungen in die Schalendrüse erfolgte in ähnlicher Weise wie die Entnahme von Schalendrüsensekret. Die Hennen wurden auf einem Gestell nach HOOVER und SMITH (1958) so fixiert, daß der Hinterleib hochgelagert war. Durch das Orificium externum wurde nun unter digitaler Kontrolle ein Katheter (Fa. Ruesch; I.D. Ø 2,5 mm), in den ein dünner PVC-Schlauch eingeklebt war, in den Raum zwischen Organwand der Schalendrüse und teilmineralisiertem Ei eingeführt.

Durch diesen PVC-Schlauch wurden 0,4 - 0,8 ml radioaktive Lösung und anschließend 0,3 ml Puffer einge-

geben. Die Hennen mußten nach erfolgter Infusion sofort wieder in ihren Käfig gesetzt werden, da sie sonst häufig durch Pressen im abdominalen Bereich eine vorzeitige Eiablage provozierten.

b) Aufbereitung der Eischale und Messung der in ihr enthaltenen ^{14}C -Aktivität

Einhalt und Eihäute der markierten Eier wurden verworfen. Die Eischale wurde gewaschen und bei einer Temperatur von 105°C zwei Stunden getrocknet. Nach Bestimmung des Trockengewichtes wurde die Schale in einem Mörser staubfein zerkleinert.

Zur ^{14}C -Aktivitätsmessung wurden 500 mg der pulverisierten Eischale in 15 g Gel-Scintillator bestehend aus:

- 5,0 g 2,5 Diphenyloxazol (PPO)
- + 0,1 g 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol (Dimethyl-POPOP)
- + 43,0 g Aerosil
- + 8,0 g Etopen
- ad 1 l Toluol

suspendiert. Die Probengläschen wurden verschraubt und geschüttelt. Die Messung der ^{14}C -Aktivität erfolgte mit dem Tri-Carb-Scintillationsspektrometer in gleicher Weise wie die Messung der ^{14}C -Aktivität der Schalendrüsensekretproben (Siehe Kapitel D.3.b. .).

V. ERGEBNISSE

Im nachstehenden Teil werden die im vorigen Kapitel beschriebenen Versuche im einzelnen dargestellt.

A. Der Gesamtproteingehalt im Schalendrüsensekret

Um den Eiweißgehalt des Schalendrüsensekrets in Abhängigkeit vom Grad der Eischalenbildung zu ermitteln, wurde eine Einteilung der 25 untersuchten Sekretproben in drei Gruppen $\blacktriangledown$ entsprechend den 3 von uns definierten Stadien der Eischalenmineralisation (siehe Methodik, Kap. B) - vorgenommen.

In Tabelle 2 sind diese Ergebnisse aufgeführt. Wie daraus hervorgeht, fällt die Proteinkonzentration im Schalendrüsensekret mit fortschreitender Eischalenformation durchschnittlich von 0,209 g/100 ml (Stadium I) auf 0,111 g/100 ml (Stadium III). Um zu prüfen, ob die festgestellten Unterschiede zufallsbedingt sind, wurde der Rangfolgetest nach WILCOXON angewandt. Dieser Test ergab signifikante Unterschiede hinsichtlich des Proteingehaltes im Schalendrüsensekret zwischen Stadium I und III ($p < 0,01$) und zwischen Stadium II und III ($p < 0,05$), während sich die Differenz zwischen Stadium I und II statistisch nicht sichern ließ.

B. Die Differenzierung und Identifizierung der Proteine

Bei Anwendung der Celluloseacetat-Elektrophorese konnten im Schalendrüsensekret der Legehenne 4 bis 6 Proteinfractionen nachgewiesen werden. Durch Vergleich mit Testpro-

Tabelle 2

Proteingehalt von Schalendrüsensekreten
von Legehennen mit 3 unterschiedlichen
Mineralisationsstadien des Eies

Stadium der Mineralisation des Eies	Anzahl der Proben	höchster Proteinwert in g/100 ml	niedrigster Proteinwert in g/100 ml	Mittelwert	Standardabweichung
I	9	0,267	0,132	0,209	$\pm 0,050$
II	7	0,243	0,109	0,158	$\pm 0,049$
III	9	0,179	0,080	0,111	$\pm 0,033$

teingemischen (Eiklar) konnten diese Proteine identifiziert bzw. in Proteingruppen eingeordnet werden. Dies geschah durch Ermittlung der relativen Wandergeschwindigkeiten (R-Werte) der einzelnen Eiweißfraktionen bezogen auf die Strecke zwischen Start (R-Wert = 0) und Gipfel der Albuminfraktion (R-Wert = 100).

Im Schalendrüsensekret der Legehenne wurden neben 2 Albuminfraktionen 2 - 3 Proteinfractionen im Bereich des Conalbumins nachgewiesen (R-Werte: $30,8 \pm 0,3$; $34,0 \pm 1,2$; $38,3 \pm 1,1$). Daneben wurden in einzelnen Proben noch 1 - 2 weitere Proteine gefunden, jedoch in so geringer Menge, daß eine densitometrische Auswertung meist nicht gelang. Ovalbumin (R-Wert der Hauptfraktion = $92,7 \pm 1,3$) und Transferrin (R-Wert = $54,2 \pm 0,2$) wurden elektrophoretisch in keiner Sekretprobe nachgewiesen.

In Tabelle 3 sind die R-Werte der Schalendrüsensekretproteine im Bereich des Conalbumins und zum Vergleich die R-Werte der Testproteine (Eiklar-Conalbumin und "Chicken-Conalbumin", Mann Research Laboratories) aufgeführt. Im Schalendrüsensekret wurden drei Proteinfractionen im Conalbuminbereich gefunden, die allerdings nur in zwei untersuchten Proben alle gleichzeitig vorkamen; dies erklärt die unterschiedliche Anzahl der zugrundegelegten Auswertungen. Die 3 Fraktionen wurden hier mit den Buchstaben A, B und C bezeichnet.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, lassen sich deutliche Übereinstimmungen der R-Werte der Schalendrüsensekretproteine im Conalbuminbereich und der Testproteine feststellen.

Tabelle 3

Relative Wandergeschwindigkeiten (R-Werte) im
Conalbumin-Bereich geordnet in 3 Fraktionen (A, B, C)

Fraktion im Conalbumin- Bereich	Schalendrüsens- ekretproteine			Eiklar			Testprotein Conalbumin		
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
A	4	$30,8 \pm 0,3$		7	$31,0 \pm 1,1$		-	-----	
B	14	$34,0 \pm 1,2$		-	-----		2	$33,2 \pm 1,1$	
C	12	$38,3 \pm 1,1$		7	$39,3 \pm 2,4$		2	$39,3 \pm 1,5$	

Anmerkung: n = Anzahl der zugrundegelegten
Auswertungen

$\bar{x}$ = Mittelwerte

s = Standardabweichung

Zur Verdeutlichung dieser Übereinstimmung im Conalbuminbereich sind in Abb. 1 Elektropherogramme von Schalendrüsensekretprotein, Eiklar und Conalbumin zusammengestellt. Die Elektrophorese aller 3 Proben erfolgte auf einem Celluloseacetatstreifen. In der Abbildung sind nur der Albumin- und der Conalbuminbereich berücksichtigt. Im Albuminbereich besteht ein deutlicher Abstand zwischen Eiklar-Ovalbumin und der Albuminfraktion des Schalendrüsensekrets.

Bei der densitometrischen Auswertung der Elektropherogramme wurde mit Hilfe der Integratoreinheiten die Menge der einzelnen Proteinfractionen des Schalendrüsensekrets in Prozent der Gesamtproteinmenge ermittelt. Die Eiweißfraktionen im Conalbumin- bzw. Albuminbereich wurden jeweils zusammengefaßt. Im Durchschnitt ergab die Integration von 13 Elektropherogrammen folgende Werte:

Vom Gesamtprotein (100%) befanden sich

im Conalbuminbereich	$22,0 \pm 3,85 \%$
im Albuminbereich	$76,9 \pm 4,14 \%$

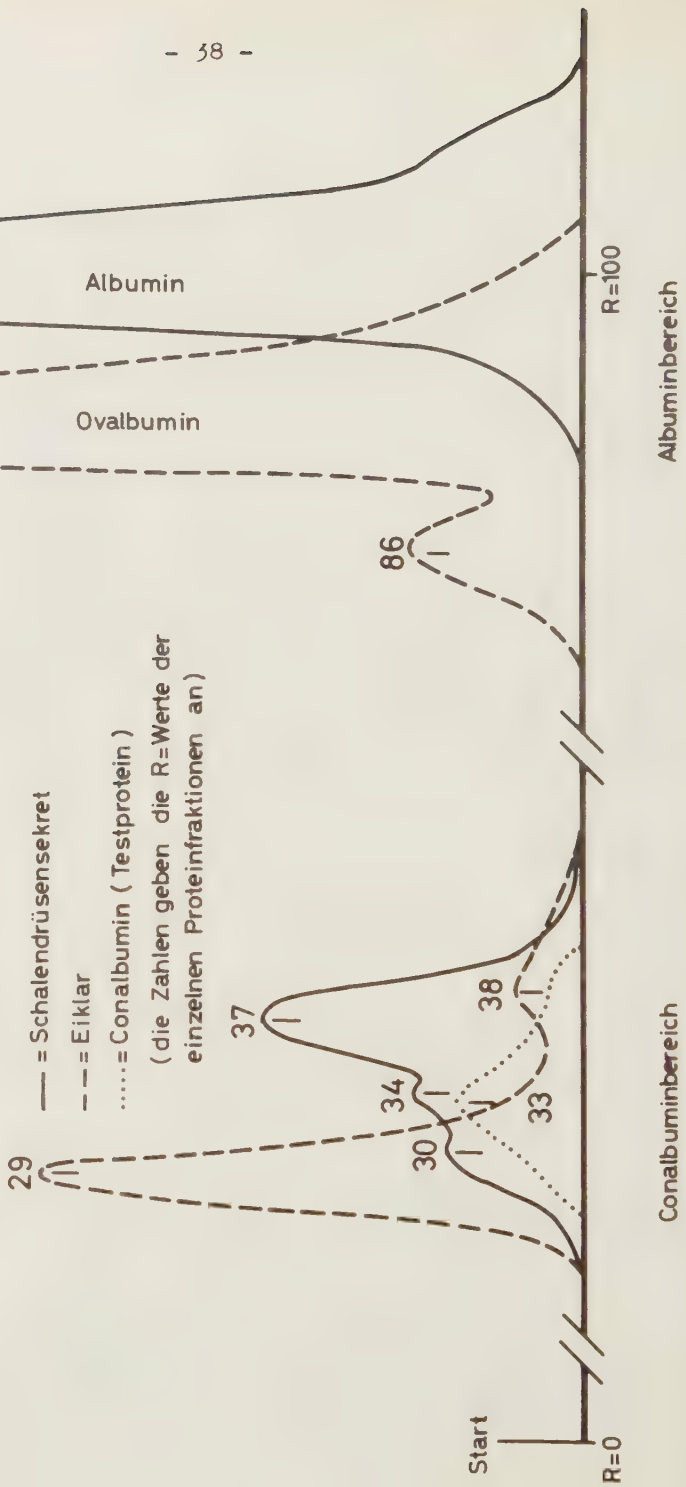
Bei der geringen Probenzahl waren Unterschiede in der prozentualen Verteilung der Proteine in Abhängigkeit vom Stadium der Eischalenmineralisation nicht festzustellen.

C. Das Bindevermögen der Schalendrüsensekretproteine für ^{59}Fe und $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$

Aus der Literatur ist bekannt, daß Conalbumin die Fähigkeit besitzt, Eisen und Bicarbonat komplex zu binden. Es wurden daher zur weiteren Identifizierung der Proteine im Schalendrüsensekret deren Bindefähigkeit in dieser Hinsicht geprüft.

Abb.1: Darstellung von 3 Elektropherogrammen

(nur im Conalbumin- und Albuminbereich)



1. Die Bindung von ^{59}Fe an die Proteine im Schalendrüsensekret

Zwei Proben eines eingeeengten ^{59}Fe -markierten Schalendrüsensekretes wurden auf einen Celluloseacetatstreifen aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung der in den Proben enthaltenen Eiweiße ist der Streifen der Länge nach zerschnitten worden. Während der eine Teil des Elektropherogrammes gefärbt wurde, erfolgte eine ^{59}Fe - γ -Aktivitätsmessung der in 5 mm breite Querstreifen zerlegten Parallelprobe. Durch Vergleich des gefärbten Elektropherogrammes mit der ^{59}Fe - γ -Aktivität entsprechender Abschnitte der Gegenprobe konnte ermittelt werden, daß das proteingebundene ^{59}Fe im Bereich der als Conalbumin vermuteten Fraktion konzentriert ist (siehe Abb. 2).

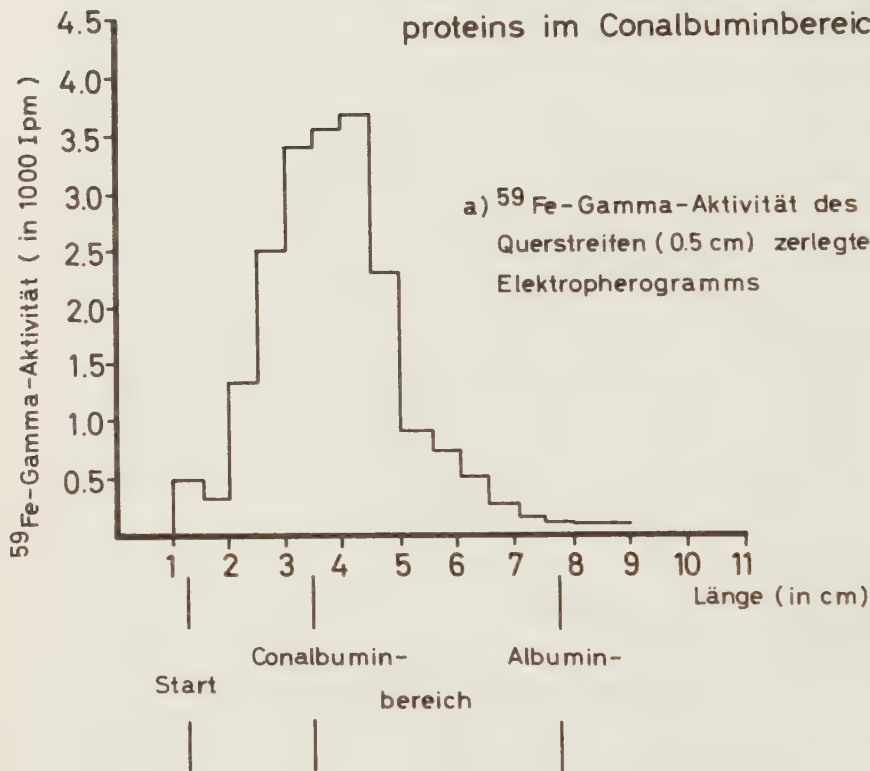
Dieses Ergebnis konnte in 5 weiteren, in gleicher Weise durchgeführten Versuchen bestätigt werden.

2. Die Bindung von ^{14}C -Bicarbonat an die Proteine im Schalendrüsensekret

Der Nachweis, daß das Schalendrüsensekret Eiweiß enthält, welches Bicarbonat bindet, gelang mit Hilfe der Säulenchromatographie.

Bei der Aufteilung in einzelne Fraktionen, um das proteingebundene vom freien ^{14}C -Bicarbonat zu trennen, war eine Differenzierung der einzelnen Schalendrüsensekretproteine nicht möglich, da wegen der geringen zur Verfügung stehenden Sekretmenge nur eine kleine Säule verwendet werden konnte.

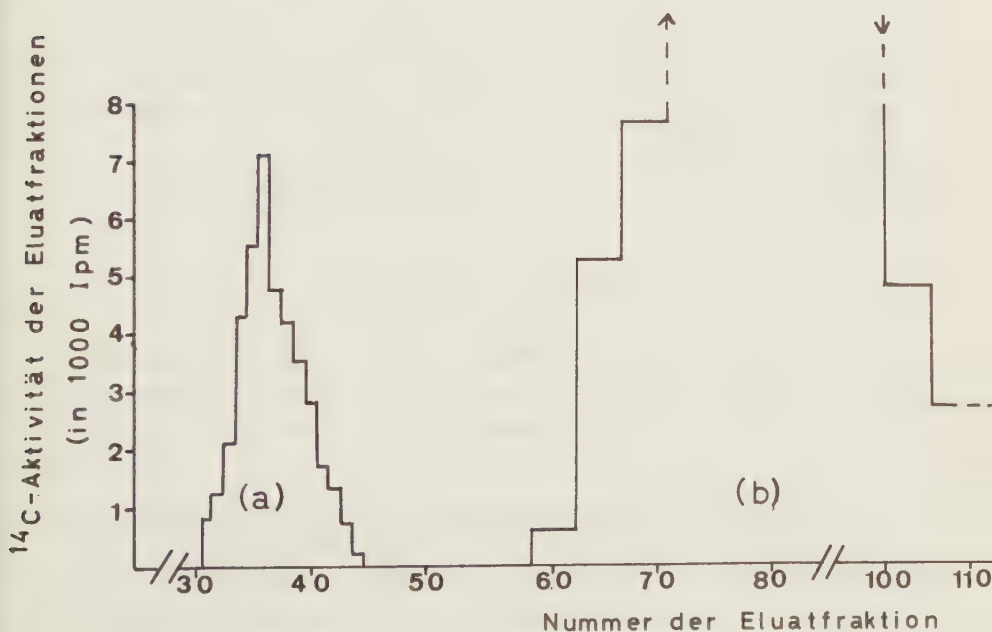
Abb.2a)b): Darstellung der ^{59}Fe -Bindung an Fraktionen des Schalendrüsensekretproteins im Conalbuminbereich



In Abb. 3 sind die Werte der einzelnen Fraktionen des Eluates hinsichtlich ihrer ^{14}C -Aktivität dargestellt. (Die Fraktionen des proteingebundenen ^{14}C -Bicarbonats sind einzeln aufgeführt; von dem freien Bicarbonat sind je 4 Proben zusammengefaßt.)

Wie aus der Abbildung hervorgeht, wurde eine deutliche Trennung des an die Schilddrüsensekretproteine gebundenen und des freien ^{14}C -Bicarbonates erreicht.

Abb. 3: Säulenchromatographische Trennung von an Schilddrüsensekretproteine gebundenem (a) und freiem (b) ^{14}C -Bicarbonat



Durch eine Überschlagsrechnung wurde versucht, die erreichte ^{14}C -Bicarbonat-Anlagerung an die Proteine des Schalendrüsensekrets in % des Sättigungswertes zu schätzen. Hierzu ist eingeeingtem Schalendrüsensekret ^{14}C -markiertes Bicarbonat und stabiles Eisen in einer Menge zugesetzt worden, die dem 10-fachen dessen entsprach, was unter Zugrundelegung des im Ansatz vorhandenen Conalbumins und dessen Bindekapazität für Bicarbonat maximal fixiert werden konnte (Sättigungswert).

Zu dem eingeeingtem Schalendrüsensekret mit ca. 2 mg Conalbumin (Schätzwert aufgrund der elektrophoretischen Untersuchungen) wurden $0,48 \mu\text{Mol NaH}^{14}\text{CO}_3$ mit einer Aktivität von $20 \mu\text{Ci}$ gegeben und inkubiert.

$20 \mu\text{Ci}$ entsprachen bei unserer Meßeinstellung 20 Millionen Ipm. Aufgrund unserer Überlegung konnten maximal 10% des zugesetzten ^{14}C -Bicarbonats an die Proteine gebunden werden. Dies entspricht einer ^{14}C -Aktivität von $2 \mu\text{Ci}$ bzw. 2 Millionen Ipm. Tatsächlich wurden in der Proteinfraktion nach der Säulenpassage 49.800 Ipm gemessen.

Hieraus ergibt sich eine erreichte prozentuale $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ -Proteinfixierung

$$\text{von: } \frac{49.800}{2.000.000} \times 100 = 2,49$$

Das heißt, daß an 2,49 % der Proteinmoleküle, die nach unseren Überlegungen Bicarbonat binden können, tatsächlich eine Anlagerung von ^{14}C -Bicarbonat erfolgte.

D. Die Bindung von ^{14}C -Bicarbonat an Conalbumin und Transferrin

Es wurden 6 Präparationen durchgeführt, für die je 10 mg Conalbumin (isoliert aus Eiklar) und Transferrin ("Transferrin bovine"; Koch & Light) verwendet wurden.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieser Versuche aufgeführt. Danach war ^{14}C -Bicarbonat im Durchschnitt nur zu $4,45 \pm 1,3$ % der maximal möglichen Bindungskapazität dieser Proteine für Bicarbonat an Conalbumin bzw. Transferrin angelagert worden. Unterschiedliche Inkubationszeiten (2 Stunden - 3 Tage) beeinflussten das Ausmaß der ^{14}C -Bicarbonat-Protein-Komplexbindung nicht. Ebenfalls konnten keine Differenzen zwischen Conalbumin und Transferrin hinsichtlich ihrer Eigenschaft, Bicarbonat zu binden, festgestellt werden.

Tabelle 4

Die Bindung von ^{14}C -markiertem Bicarbonat an Conalbumin und Transferrin

Versuch Nr.	Protein	Inkubationszeit bei 40°C	Anteil der $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ -Anlagerung an Conalbumin bzw. Transferrin in % des Sättigungswertes
1	Conalbumin	3 Tage	4,9
2	"	2 Tage	6,0
3	"	2 Tage	2,2
4	"	1 Tag	5,1
5	Transferrin	2 Tage	4,7
6	"	2 Stunden	3,8
			$\bar{x} = 4,45 \pm 1,3$

Die Stabilität des ^{14}C -Bicarbonat-Conalbumin-Komplexes wurde durch eine erneute Passage durch die Sephadexsäule geprüft. Es zeigte sich, daß von der aufgetragenen ^{14}C -Aktivität 97,3% in der proteingebundenen Fraktion verblieben.

E. Der ^{14}C -Einbau in den mineralischen Teil der Eischale nach Infusion von proteingebundenem und freiem ^{14}C -Bicarbonat in die Schalendrüse von Legehennen

Durch direkte Infusion von proteingebundenem ^{14}C -Bicarbonat in die Schalendrüse sollte festgestellt werden, ob und in welcher Menge dieses ^{14}C in die teilmineralisierte Eischale eingelagert wird. Zum Vergleich wurde anderen Legehennen freies, gepuffertes ^{14}C -Bicarbonat in die Schalendrüse infundiert.

Als Maß zur Ermittlung des in die Eischale eingebauten ^{14}C -Anteils (x) in % ist die in der Eischale gemessene ^{14}C -Aktivität auf die insgesamt in die Schalendrüse infundierte ^{14}C -Aktivität bezogen worden.

$$x = \frac{\text{H}^{14}\text{CO}_3^- \text{-Aktivität der Infusionslösung}}{^{14}\text{C-Aktivität der Eischale}} \cdot 100$$

Auf diese Weise wurde die ^{14}C -Einlagerung in die Eischale an insgesamt 38 Legehennen ermittelt. Je 19 Tieren wurde proteingebundenes bzw. freies ^{14}C -Bicarbonat in die Schalendrüse infundiert.

Tabelle 5

^{14}C -Einlagerung in die teilmineralisierte Eischale
nach Infusion von proteingebundenem $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ bzw.
freiem $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ in die Schalendrüse

Gruppe	Infusionslösung	Anzahl der Tiere n	Einbau der infundierten ^{14}C - aktivität in %		
			höchster Wert	niedrigster Wert	Gesamt- Mittel- Wert
I	an Conalbumin gebundenes $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$	19	24,4 %	8,1 %	$15,0 \pm 4,6$ %
II	freies gepuffertes $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$	19	13,2 %	3,3 %	$7,3 \pm 2,9$ %

Der Unterschied der ^{14}C -Einlagerung zwischen beiden Gruppen erwies sich nach dem Rangfolgetest von WILCOXSON als hochsignifikant ($p < 0,01$)

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, ist das proteingebundene ^{14}C -Bicarbonat durchschnittlich zu $15,0 \pm 4,6 \%$ in die Eischale eingebaut worden. Nach Infusion des freien ^{14}C -Bicarbonats betrug die ^{14}C -Einlagerung im Durchschnitt nur $7,8 \pm 2,9 \%$ der in die Schalendrüse eingebrachten ^{14}C -Aktivität. Die zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des ^{14}C -Einbaus festgestellte Differenz erwies sich nach dem Rangfolgetest von WILCOXSON als hochsignifikant ($p < 0,01$).

Bei unterschiedlicher Verweildauer der Eier in der Schalendrüse nach der Infusion (15 Minuten bis 12 Stunden) konnte kein signifikanter Unterschied der ^{14}C -Einlagerung in die Eischale festgestellt werden.

VI. DISKUSSION

Im folgenden Kapitel sollen die von uns hinsichtlich der Zusammensetzung des Eiweißes im Schalendrüsensekret des Huhnes gefundenen Ergebnisse mit den wenigen bisher in der Literatur vorliegenden Angaben verglichen und diskutiert werden.

A. Zum Gesamtproteingehalt des Schalendrüsensekretes

Im Gegensatz zu dem von BEADLE et al. (1938) angegebenen Wert von durchschnittlich 0,4 g/100 ml Protein im Schalendrüsensekret von Legehennen wurden von uns nur Eiweißmengen von durchschnittlich 0,1 - 0,2 g/100 ml in diesem Sekret nachgewiesen. Diese Differenz ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß BEADLE andere Nachweisverfahren oder andere Hühnerrassen verwendete. Wahrscheinlicher ist allerdings, daß der höhere Proteingehalt durch Fehler bei der Entnahme des Schalendrüsensekretes hervorgerufen wurde. Wir fanden nämlich in Proben, die geringe Spuren von Blut oder Epithelzellen enthielten, ähnlich hohe N-Werte wie der oben genannte Verfasser.

Bei den vorliegenden Untersuchungen erwies sich, daß der Proteingehalt des Sekretes während der verschiedenen Stadien der Eischalenmineralisation unterschiedlich hoch ist. Am höchsten ist der Eiweißgehalt zu Beginn der Mineralisation der Eischale (Stadium I) mit $0,209 \pm 0,050$ g/100 ml und am niedrigsten gegen Ende der Eischalenbildung (Stadium III) mit $0,111 \pm 0,033$ g/100 ml. Diese zwischen den Mineralisationsstadien I und III gefundenen Unterschiede des Proteingehaltes im Schalendrüsensekret erwiesen

sich als signifikant ($p < 0,01$). Dies könnte dadurch zu erklären sein, daß im Anfangsstadium der Eischalenmineralisation mehr Proteine von der Schalendrüse für den Aufbau der Matrix produziert werden.

Vom Stadium der Eischalenmineralisation abhängige Veränderungen hinsichtlich des jeweiligen Anteils der elektrophoretisch getrennten Proteinfractionen am Gesamteiweißgehalt waren allerdings nicht feststellbar.

B. Zur Herkunft der Proteine im Schalendrüsensekret

Während SCOTT et al. (1937) die geringe, im Schalendrüsensekret enthaltene Eiweißmenge entweder als Produkt der Schalendrüse für den Aufbau der Matrix oder als Eiklar aus den kranial gelegenen Abschnitten des Legedarmes deuten, vermuten BEADLE et al. (1938), daß es sich bei diesen Proteinen um Eiklar handelt, das durch die Eihäute hindurch ins Lumen der Schalendrüse gelangt.

Gegen diese Ansichten, für die ein experimenteller Beweis nicht gebracht wurde, spricht allerdings, daß in den von uns untersuchten Sekretproben elektrophoretisch niemals Ovalbumin nachzuweisen war.

Da in allen Schichten des Eiklars ein weitgehend homogenes Proteingemisch aus Ovalbumin, Conalbumin und anderen Eiweißkörpern vorliegt, und da das Molekulargewicht des Ovalbumins (47.000) erheblich unter dem des Conalbumins (87.000) liegt, ersteres also leichter durch die Eihäute zu diffundieren vermag, kann es sich bei den Proteinen im Schalendrüsensekret kaum um verdünntes Eiklar handeln.

Durch die elektrophoretischen Untersuchungen wurde ermittelt, daß im Schalendrüsensekret neben 2 - 3 Fraktionen im Bereich des Conalbumins (durchschnittlich $22,0 \pm 3,85$ % der Gesamtproteinmenge) auch Albumin ($76,9 \pm 4,14$ %) vorkommt. Transferrin konnte in keiner Probe nachgewiesen werden.

Wie aus der Literatur hervorgeht, besitzen die Proteine Conalbumin und Transferrin die Fähigkeit, Eisen und Bicarbonat zu binden, und zwar pro Eiweißmolekül zwei Eisenatome und zwei Bicarbonationen.

Durch Säulenchromatographie konnte nachgewiesen werden, daß ^{14}C -Bicarbonat von den Schalendrüsensekretproteinen gebunden wird. Weiter konnte durch ein elektrophoretisches Verfahren festgestellt werden, daß ^{59}Fe nur von der im Bereich des Conalbumin gelegenen Proteinfraction fixiert wird.

Es darf daher als sehr wahrscheinlich angesehen werden, daß im Schalendrüsensekret des Huhnes Conalbumin vorkommt. Eine eindeutige Identifizierung wäre allerdings nur durch eine Aminosäuresequenzanalyse möglich. Da Conalbumin im Serum des Huhnes nicht vorkommt, ist anzunehmen, daß dieses Protein in der Schalendrüse produziert wird.

Ausgehend von den Angaben in der Literatur, aus denen hervorgeht, daß Conalbumin maximal pro Mol zwei Mol Bicarbonat und zwei Mol Eisen zu binden vermag (Sättigungswert), konnte in unserem Bindungsversuch das Conalbumin im Schalendrüsensekret nur zu etwa 2,5% des Sättigungswertes mit ^{14}C -markiertem Bicarbonat angereichert werden.

In 6 Versuchen, in denen die Bindung von ^{14}C -Bicarbonat an reines Conalbumin bzw. Transferrin ermittelt wurde, konnten im Durchschnitt nur $4,45 \pm 1,30$ % des Sättigungswertes erreicht werden.

Bei einer Überprüfung der Eisenbindung an Conalbumin gelang es dagegen, 27,5% des theoretisch möglichen Sättigungswertes für den Protein-Eisen-Komplex zu erzielen.

Die relativ geringe Anlagerung von ^{14}C -Bicarbonat an Conalbumin ist höchstwahrscheinlich durch eine hohe Verdünnung des markierten Bicarbonats mit stabilem CO_2 zu erklären (Austauschreaktion).

C. Zur Fähigkeit des Conalbumins, Bicarbonat bei der Eischalenbildung zu transportieren

Es erhebt sich nun die Frage, ob dem Conalbumin im Schalendrüsensekret mit seiner Fähigkeit, Eisen und Bicarbonat zu binden, eventuell eine Funktion bei der Eischalenmineralisierung zukommt.

Nach der Hypothese von DIAMANTSTEIN (1966) werden Bicarbonationen von der Schalendrüse in das Uteruslumen sezerniert und an den Eihäuten, dem Ort der Eischalenmineralisation, zu einem Proton und einem Carbonation disproportioniert. Ungeklärt ist noch, wie der Transport der Bicarbonationen an die Eischale und die Abspaltung des Protons vor sich geht.

Da im Schalendrüsensekret Proteinfractionen vorkommen, die wie Conalbumin die Fähigkeit besitzen, Bicarbonationen zu

binden, könnte diesen Proteinen möglicherweise eine Schutz- oder Transportfunktion für das Bicarbonat zukommen. Derartige Überlegungen gewinnen an Gewicht, wenn man die Angaben von SCHADE und REINHART (1966) berücksichtigt, die feststellten, daß Bicarbonat bei Änderungen des pH-Wertes um das 10 bis 100-fache schneller aus dem Protein-Eisen-Bicarbonat-Komplex dissoziiert als das Eisen.

Um zu prüfen, ob an Conalbumin fixiertes Bicarbonat überhaupt in die Eischale eingebaut wird, wurde ^{14}C -markiertes, an Conalbumin gebundenes Bicarbonat 19 Legehennen mit teil-mineralisiertem Ei direkt in die Schalendrüse infundiert. In einem Parallelversuch wurde 19 Hennen freies, gepuffertes ^{14}C -Bicarbonat verabreicht.

Obwohl die körpereigene Bicarbonatproduktion nicht unterdrückt war, wurde ein ^{14}C -Einbau aus proteingebundenem ^{14}C -Bicarbonat in einer Höhe von durchschnittlich $15,0 \pm 4,6\%$ der insgesamt verabreichten ^{14}C -Aktivität erreicht. Verglichen mit dem nicht-proteingebundenem ^{14}C -Bicarbonat (Einbau $7,9 \pm 2,9\%$) wurde demnach eine etwa doppelt so hohe ^{14}C -Einlagerung in die Eischale erzielt, wenn an Conalbumin gebundenes ^{14}C -Bicarbonat in die Schalendrüse infundiert worden ist.

Zur Prüfung, ob das proteingebundene $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ wirklich als CaCO_3 in die Eischale eingebaut wird und nicht am Protein weiterhin gebunden in der organischen Matrix vorliegt, wurde bei drei ^{14}C -markierten Eischalen die organische Substanz durch 10 Min. langes Kochen in 5%iger KOH zerstört. Zwischen der ^{14}C -Aktivität der vollständigen Eischale und dem mineralischen Anteil ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, so daß gefolgert werden kann, daß infundiertes proteingebundenes $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ tatsächlich in die Carbonatfraktion der Eischale eingelagert wurde.

Aus dem Befund, daß in Schalen von Eiern, die bereits 15 Min. nach der ^{14}C -Infusion abgelegt wurden, eine gleich hohe ^{14}C -Einlagerung festgestellt wurde wie in solchen, die 12 bis 15 Std. nach Infusion in der Schalendrüse verblieben, kann gefolgert werden, daß der Einbau von ^{14}C in die Eischale bereits nach kurzer Zeit abgeschlossen ist.

Über den Verbleib des nicht in die Eischale eingebauten, proteingebundenen ^{14}C -Bicarbonats sind - abgesehen von ^{14}C -Messungen in der Ausatemungsluft der Versuchstiere - keine weiteren Untersuchungen angestellt worden. Anders als nach Infusion von freiem ^{14}C -Bicarbonat, das größtenteils innerhalb von 60 Min. in der Exhalationsluft als CO_2 wiederzufinden ist, war von infundiertem, an Conalbumin bzw. Transferrin gebundenem ^{14}C -Bicarbonat in der Exhalationsluft keine ^{14}C -Aktivität messbar.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht eindeutig hervor, daß Proteine des Schalendrüsensekretes Bicarbonat binden können, das in vivo zur Eischalenmineralisierung verwendet wird. Über das Ausmaß der Beteiligung dieser Proteine am Bicarbonattransport bei der Eischalenbildung kann allerdings mit dieser Versuchsanstellung keine Aussage gemacht werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach Entwicklung einer einfachen Methode zur Gewinnung von Sekret aus der Schalendrüse der Legehenne wurde der Eiweißanteil dieses Sekretes quantitativ und hinsichtlich seiner Zusammensetzung untersucht.
 - a. In 25 verschiedenen Schalendrüsensekretproben wurde der Gesamtproteingehalt in Abhängigkeit vom Stadium der Eischalenmineralisation ermittelt.
Die Proteinkonzentration fällt von durchschnittlich $0,209 \pm 0,050$ g/100 ml zu Beginn der Schalenbildung (Stadium I) auf $0,111 \pm 0,033$ g/100 ml bei fortgeschrittener Mineralisation der Eischale. Die Differenz hinsichtlich des Proteingehaltes im Schalendrüsensekret zwischen Stadium I und Stadium III konnte mit $p < 0,01$ statistisch gesichert werden.
 - b. Durch elektrophoretische Untersuchungen von 14 Sekretproben wurde ermittelt, daß im Schalendrüsensekret neben Albumin 2 - 3 Proteinfraktionen im Bereich des Eiklarproteins Conalbumin vorkommen, während Ovalbumin und Transferrin nicht nachgewiesen wurden. Bei dem im Schalendrüsensekret enthaltenen Eiweiß entfallen im Durchschnitt $76,9 \pm 4,14$ % auf Albumin und $22,0 \pm 3,85$ % auf die im Conalbuminbereich nachgewiesenen Fraktionen.
 - c. Säulenchromatographisch war zu zeigen, daß ^{14}C -Bicarbonat von den Schalendrüsensekretproteinen gebunden wird. Durch ein elektrophoretisches Verfahren konnte die Bindung von ^{59}Fe an die im Conalbuminbereich lie-

2. Um zu klären, ob Conalbumin bei der Eischalenmineralisation eventuell als Vehikel für Bicarbonat in Betracht zu ziehen ist, wurde ^{14}C -Bicarbonat an dieses Protein gebunden und zur Ermittlung des ^{14}C -Einbaus in die Eischale in die Schalendrüse infundiert.
- a. Zur Herstellung eines Protein-Bicarbonat-Komplexes wurden in 6 Versuchen an je 10 mg Conalbumin oder Transferrin ^{14}C -Bicarbonat und stabiles Eisen angelagert. Ausgehend von den Angaben in der Literatur, wonach diese Proteine pro Molekül 2 Bicarbonationen und 2 Eisenatome zu binden vermögen (Sättigungswert), konnte ^{14}C -Bicarbonat durchschnittlich nur zu $4,45 \pm 1,30$ % des Sättigungswertes an das Conalbumin bzw. Transferrin fixiert werden.
- b. Im Tierversuch wurde 19 HNL-Legehennen proteingebundenes ^{14}C -Bicarbonat in die Schalendrüse infundiert; weiteren 19 Hennen wurde im Vergleich freies gepuffertes ^{14}C -Bicarbonat in gleicher Weise verabreicht. Der ^{14}C -Einbau aus proteingebundenem ^{14}C -Bicarbonat in die Eischale betrug im Durchschnitt $15,0 \pm 4,6$ % der infundierten Gesamtaktivität, während aus freiem ^{14}C -Bicarbonat durchschnittlich $7,9 \pm 2,9$ % in die Schale eingelagert wurden. Diese Differenz zwischen beiden Gruppen konnte mit $p < 0,01$ statistisch abgesichert werden.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

AIZETMÜLLER, K., K. BUCHTELA und F. GRASS (1966):
Elektrophorese von Radionukliden auf Cellogel.
J. Chromat. 22, 431-445

BARBER, A.A., C. DEMPSTER and N.G. ANDERSON (1963):
A gel filtration method for studies on protein iron binding.
Clin. chim. acta 8, 143-145

BEADLE, B.W., R.M. CONRAD and H.M. SCOTT (1938):
Composition of the uterine secretion of the domestic fowl.
Poultry Sci. 17, 498-504

BURKE, W.H. and F.X. OGASAWARA (1969):
Presence of spermatozoa in utero-vaginal fluids of the
hen at various stages of the ovulatory cycle.
Poultry Sci. 48, 408-413

COOKE, A.S. and D.A. BALCH (1970):
Studies of membrane, mammary cores and cuticle of the
hen egg shell.
Brit. Poultry Sci. 11, 345-352

COMMON, R.H. (1941):
The carbonic anhydrase of the hens oviduct.
J. Agric. Sci. 31, 412-414

CROIZIER, G. et B. SAUVEUR (1967):
Etude des modifications du comportement électro-
phorétique des protéines de l'albumen au cours de la
conservation des oeufs de poule.
Ann. biol. anim. biochim. biophys. 7, 317-321

DEL CAMPO, G.B. (1968):
New simple technique for multifractionation of serum
proteins on cellogel RS cellulose acetate strips.
Clin. chim. acta 22, 475-479

DIAMANTSTEIN , T. (1965):
Beiträge zur Biochemie der Eischalenverkalkung.
Vet. med. Habil. Schr. Berlin FU 1965

DIAMANTSTEIN, T. (1966):
Über die lokale Rolle der Carboanhydratase im Hinblick
auf die Eischalenverkalkung.
Arch. Geflügelk. 30, 309-320

DIAMANTSTEIN, T. und J. SCHLÜNS (1964):
Lokalisation und Bedeutung der Carboanhydratase im
Uterus von Legehennen.
Acta histochem. 19, 296-302

EL JACK, M.H. and B.E. LAKE (1967):
The content of the principal inorganic ions and
carbon dioxide in uterine fluids of the domestic hen.
J. Reprod. Fert. 13, 127-132

HODGES, R.D. and K. LÖRCHER (1967):
Possible sources of the carbonate fraction of egg
shell calcium carbonate.
Nature 216, 609-610

HOLMAN, H.H. (1970):
Planung und Auswertung biologischer Versuche.
Fischer, Stuttgart 1970

HOOVER, G.N. and A.H. SMITH (1958):
Secretion of fluid by the shell gland of the laying hen.
Poultry Sci. 37, 467-471

HRISTIĆ, V. (1969):
Biochemical function of transferrin
in: Trace mineral studies with isotopes in
domestic animals
Internat. Atomic Energy Agency, Vienna 1969

KUTAS, F., A. KEMÉNY and G. LENCSÉS (1970):
Studies of the influence of egg shell formation on
the acid-base balance of the laying hen.
Acta vet. Acad. scient. Hung. 20, 281-287

LÖRCHER, K., Ch. ZSCHEILE and K. BRONSCH (1970):
Transfer of continuously i.v. infused NaHCO_3 and
 $\text{Ca}^{4+}/\text{Cl}_2$ to the hen's egg-shell.
Ann. biol. anim. biochim. biophys. 10, 193-198

LUSH, I.E. (1961):
Genetic polymorphisms in the egg albumen proteins
of the domestic fowl.
Nature 189, 981-984

MONGIN, P. et B. SAUVEUR (1970):
Composition du fluide utérin et de l'albumen durant le
séjour de l'oeuf dans l'utérus chez la poule domestique.
Compt. rend. Acad. sc. 270, 1715-1718

ROMANOFF, A.L. and A.J. ROMANOFF (1949):
The avian egg.
Wiley, New York

SCHADE, A.L., R.W. REINHART und H. LEVY (1949):
Arch. Biochem. 20, 170
zit. n. WARNER, R.C. and I. WEBER (1953)

SCHADE, A.L. and R.W. REINHART (1966):
Carbondioxide in the iron and copper siderophilin complexes.
in: Protides of the biological fluids 14, 75-81
Elsevier, Amsterdam

SCHMIDT, W.J. (1962):
Liegt der Eischalenskalk der Vögel als submikrosko-
pische Kristallite vor?
Z. Zellforsch. 57, 848-880

SCHMIDT, W.J. (1966):
Das Verwachsen von Calcosphäriten bei der Schalen-
bildung des Vogeleies.
Z. Morph. Ökol. Tiere 56, 252-258

SCHMITT, J. (1968):
Das Differenzieren tierischer Proteine.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 75, 87-91

SCHRAER, H. and R. SCHRAER (1970):

Calcium translocation in the avian shell gland.
Ann. biol. anim. biochim. biophys. 10, 229-244

SCOTT, H.M., J.S. HUGHES and D.C. WARREN (1937):

Augmentation of nitrogen to the eggwhite after the
formation of the shell membranes in the fowl.
Poultry Sci. 16, 53-61

SIMKISS, K. (1961):

Calcium metabolism and avian reproduction.
Biol. Rev. 36, 321-367

SIMKISS, K. and C. TYLER (1957):

A histochemical study of the organic matrix of hen
egg shells.
Quart. J. Microsc. Sci. 98, 19-28

SIMONS, P.C.M. and G. WIERTZ (1963):

Notes on the structure of membranes and shell in the
hen's egg. An electron microscopical study.
Z. Zellforsch. 59, 555-567

SIMONS, P.C.M. and G. WIERTZ (1970):

Notes on the structure of the shell and membranes of
the hen's egg. A study with scanning electron microscope.
Ann. biol. anim. biochim. biophys. 10, 31-49

SOLOMON, S.E. (1971):

Fluctuations in total calcium and magnesium in the
plasma and uterine fluid of the domestic fowl.
Brit. Poultry Sci. 12, 165-167

STURKIE, P.D. (1965):

Avian physiology.
2. Aufl.

Cornell University Press, Ithaca, N.Y.

STUTE, K.K. (1960):

Papierelektrophoretische Untersuchungen an Eiklar-
proteinen des Hühnereies.
Arch. Geflügelk. 24, 543-556

TAYLOR, T.G. and F. HERTELENDY (1961):
Changes in the blood calcium associated with egg shell
calcification in the domestic fowl.
2. Changes in the diffusible calcium.
Poultry Sci. 40, 115-123

WALDSCHMIDT-LEITZ, E. (1957):
Chemie der Eiweißkörper
2. Aufl.
Enke, Stuttgart

WARNER, R.C. and I. WEBER (1953):
The metal combining properties of conalbumin.
J. Amer. Chem. Soc. 75, 5094-5102

WARREN, D.C. and H.M. SCOTT (1935):
The time factor in egg formation.
Poultry Sci. 14, 195-207

WINDLE, J.J., A.K. WIERSEMA, J.R. CLARK and
R.E. FEENEY (1963):
Investigation of the iron and copper complexes of
avian conalbumins and human transferrins by electron
paramagnetic resonance.
Biochemistry 2, 1341-1345

WOODWORTH, R.C. (1966):
The mechanism of metal binding to conalbumin and
siderophilin.
in: Protides of the biological fluids 14, 37-44
Elsevier, Amsterdam

ZSCHEILE, Ch. (1969):
Zur Frage der Beteiligung von Bicarbonationen
des Blutplasmas bei der Eischalenmineralisation.
Vet. med. Diss. Berlin FU 1969

Herrn Prof. Dr. Kurt Bronsch danke ich für die gebotene Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Konrad Lörcher für die Überlassung des Themas, die stets gewährte Hilfe bei der Planung und Durchführung der Versuche sowie für die Durchsicht der Arbeit.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für ihre freundliche Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 7.2.1943 wurde ich als Sohn des Meteorologen Dr. Johann Brand und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Herr, in Berlin geboren.

Von 1949 bis 1955 besuchte ich die Grundschule in Bremen und im Anschluß daran das Alte Gymnasium in Bremen, wo ich 1963 das Abitur bestand.

Anschließend begann ich an der Justus-Liebig Universität in Gießen mit dem Studium der Veterinärmedizin, das ich nach Überwechslung an die Freie Universität Berlin mit dem Staatsexamen 1969 abschloß. Die Approbation als Tierarzt wurde mir im Juni 1969 erteilt.

Seit 1970 bin ich im Institut für Tierzucht und Tierernährung der Freien Universität Berlin als wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig.

